

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-193661

(43)Date of publication of application : 14.07.2000

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/53

---

(21)Application number : 10-368607 (71)Applicant : TOKYO RIKA KIKAI  
KK

(22)Date of filing : 25.12.1998 (72)Inventor : TSUGITA AKIRA  
UENO IKUKO  
TAKAHASHI  
NAOYUKI  
OKI HIROTA

---

### (54) INSPECTING METHOD FOR DEMENTIA

#### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To inspect dementia by utilizing the antigen-antibody reaction between the polypeptide specific to a dementia patient contained in a specimen, such as sampled blood and the antibody for the immunoassay of polypeptide.

**SOLUTION:** It is sufficient that a polypeptide specific to a patient exist in a small quantity of blood at a level for allowing measurement in this inspecting method for dementia which includes Alzheimer's disease and Down's syndrome. The polypeptide specific to the patient includes polypeptide modified by sugar chains such as glycoprotein, and it includes a polypeptide which exists only in dementia patients, a polypeptide also existing in healthy persons but at significantly different quantity of existence, or the polypeptide existing in both of them and having different structures. The polypeptide for the Alzheimer's disease to be inspected includes amyloid A1 and amyloid A2-8. A polyclonal antibody or a monoclonal

antibody may be used as the antibody used for the immunoassay utilizing the antigen-antibody reaction and is prepared by a known method. The immunoassay includes quantification and detection.

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1]

An inspection method of dementia characterized by comprising the following. Polypeptide specific to a dementia patient which extracts a sample which is a patient's blood, a blood serum, or plasma, and is contained in this sample. By immunoassay using an antigen-antibody reaction with an antibody to this polypeptide, specific polypeptide is measured to a dementia patient contained in a sample.

[Claim 2]

A way according to claim 1 said dementia is an Alzheimer disease.

[Claim 3]

A method according to claim 1 or 2 of checking an amino acid sequence of a spot, applying said immunoassay to two dimensional electrophoresis which it is based on the 1st shaft orientations at an isoelectric point, it is based on a molecular weight in a sample in the 2nd shaft orientations, and is separated, and maintaining an electrophoretic pattern.

[Claim 4]

A method given in any 1 paragraph of claims 1 thru/or 3 which are at least one sort chosen from a group to which said polypeptide changes from the amyloid A 1, amyloid A 2-beta, the apolipoprotein E4, and an apolipoprotein J beta chain.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to the inspection method of dementia like an Alzheimer disease.

[0002]

[Description of the Prior Art]

Before, the inspection of dementia like an Alzheimer disease is conducted considering the morphologic change of brains, such as intelligence test and CT test, as a decision criterion. However, these inspections are indirect. Dementia cannot necessarily be diagnosed correctly.

[0003]

On the other hand, it is also known that protein like amyloid which appears specifically in an Alzheimer disease patient exists. However, these protein is obtained from a patient's brain cell, and since it is difficult to extract a brain cell from a patient for an inspection, inspecting an Alzheimer disease is not conventionally conducted by detecting these protein.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The purpose of this invention is to provide the inspection method of dementia which can inspect dementia by measuring the protein contained in the body fluid of a patient's small quantity.

[0005]

[Means for Solving the Problem]

Wholeheartedly, as a result of research, an invention-in-this-application person found out that this protein that protein specific to a dementia patient

is contained in blood, and is contained in a little extractable blood could be measured by immunoassay, and completed this invention.

[0006]

By namely, immunoassay using an antigen-antibody reaction of polypeptide specific to a dementia patient which this invention extracts a sample which is a patient's blood, a blood serum, or plasma, and is contained in this sample, and an antibody to this polypeptide. A dementia patient contained in a sample is provided with an inspection method of dementia which comprises measuring specific polypeptide.

[0007]

[Embodiment of the Invention]

The dementia which can be inspected by the method of this invention is not limited especially if polypeptide peculiar to the patient of this dementia is what is measurable in a little blood that recognizes quantity existence, and it can mention an Alzheimer disease, Down's syndrome, etc. In this invention, the polypeptide embellished by the sugar chain etc. is also included like glycoprotein with "polypeptide."

[0008]

In the method of this invention, the polypeptide specific to a dementia patient contained in a patient's blood, a blood serum, or plasma (following and "blood etc.") is measured. To "polypeptide specific to a dementia patient", although it exists in the polypeptide which exists only in a dementia patient and does not exist in a healthy person, a dementia patient, and both of a healthy person, here, Although the abundance exists in an intentionally different thing in both, a dementia patient, and both of a healthy person, thing \*\* from which the structure differs in both is included. When a subject of examination is an Alzheimer disease, as an example of such polypeptide The amyloid A 1, amyloid A 2-beta, The apolipoprotein E4 (D. J. Selkoe, Alzheimer's Disease: Genotypes, phenotype and treatments, Science275, and 630 (1997)), Apolipoprotein J beta chain (The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amylo beta is complexed to SP-40, 40(apolipoprotein J, an inhibitor of the complement. membrane-attack complex, J. . [ Biochem. / Ghiso et al. and ] J.293, 27-30 (1993), and the presenilin 1 and 2 (D. -- J. Selkoe and Alzheimer's Disease: [ ] --) [ Genotypes, phenotype and treatments and ] Although Science275, 630 (1997), etc. can be mentioned, it is not limited to these. Such polypeptides have a publicly known amino acid sequence of the fields of all the.

[0009]

In the method of this invention, specific polypeptide is measured to the dementia patient contained in a sample by the immunoassay which used the antigen-antibody reaction of specific polypeptide and the antibody to this polypeptide for the dementia patient. As an antibody used here, a polyclonal antibody or a monoclonal antibody may be sufficient, and these can be prepared by the well-known method. Although "polypeptide specific to a dementia patient" exists in a dementia patient and both of a healthy person, in being that from which the structure differs, Although it reacts to the polypeptide which exists in a dementia patient, it cannot be overemphasized that the polypeptide concerned which exists in a healthy person needs to use the antibody which does not react. The immunoassay itself is common knowledge in this field, and as long as it has the sensitivity which can measure the above-mentioned specific polypeptide contained in blood etc., any publicly known immunoassay is employable. That is, if it classifies according to a measurement principle, there are a sandwich technique, the competing method, a condensation method, etc., if it classifies according to a sign, there are enzymatic process, a fluorescence method, a radiation method, the biotin method, etc., but these all are employable. In this invention, and both of detection are included. [ "it measures" ]

[0010]

Especially, in advance of an antigen-antibody reaction, a sample can be applied to the two dimensional electrophoresis which is based on the 1st shaft orientations at an isoelectric point, is based on a molecular weight in the 2nd shaft orientations, and is separated as a desirable method [ that it is exact and high sensitivity ], and the method of performing immunoblotting with an electrophoretic pattern maintained can be mentioned. As for a sample, when using this method, it is preferred to use the blood serum or plasma which does not contain a corpuscle component. Isoelectric focusing, the electrophoresis separated based on a molecular weight, and the technique of immunoblotting itself are common knowledge in this field, and the example is indicated in detail also in the following example.

[0011]

[Example]

Hereafter, based on an example, this invention is explained concretely. But this invention is not limited to the following example.

[0012]

Plasma was separated from blood every 200microl extracted under sodium-acid-citrate existence from generation of 160-70 years old of

examples Alzheimer patient, patients other than the illness of the same age, and a healthy volunteer, and what carried out cryopreservation into a -20 \*\* freezer was used as the experimental material.

[0013]

Washing removal of a fat, salts, etc. which are intermingled in the protein which settled human plasma protein by triphloroacetic acid (TCA), and precipitated was carried out with ether. These operations were specifically performed as follows.

[0014]

1 ml of 5.5%TCA solutions which cooled each 100micro of human plasma samples l dissolved at the room temperature in ice water in the small tube, and ice-cooled them especially in it were added, and it mixed. the small high-speed centrifuge cooled at 4 \*\* after ice-cooling this mixture liquid for 1 hour -- 16000 rpm -- it centrifuged for 15 minutes. After throwing away supernatant liquid, water 150mul ice-cooled to precipitate was added, and it was considered as suspension. Every 1 ml of ether washed this 5 times. After removing under decompression the water layer which remained after removing ether, the buffer solution (2% Nonidet-P40 (trade name), 9.8 M urea, 2% Pharmalyte (trade name), and 1.5% DICHI male rye toll (DTT)) of 350microl was added to protein, and it dissolved in it. The low-molecular-weight marker made from Bio Rad and a little bromphenol blue were added to the solution.

[0015]

The protein solution prepared by the above-mentioned method is put in the gel swelling container of a Pharmacia manufacture, The dry gel strip for Pharmacia manufacture isoelectric focusing (Immobilone dry strip pH 3-10 (18 cm or 11 cm)) was dipped in this, gel was swollen for 16 hours, and the protein solution was made to absorb simultaneously.

[0016]

By the whole of 3500V 15 hours, 64 kVh was applied to the last and isoelectric focusing of the swollen gel strip was carried out to it for 500V, then 500V-3500V 5 hours for 3 hours in the beginning. after migration and a gel strip -- a balanced buffer (6M urea and 3% SDS.) 50 mM Tris-HCl After equilibrating in inside (pH 6.8), It is made to stick on 12.5% polyacrylamide monotonous gel (20 cmx20 cmx1 cm), The electric power of 16 W/gel performed electrophoresis of the two-dimensional eye in the Tris-glycine buffer (Cathode 25 mM Tris, Anode50 mM Tris, 1% SDS, pH 8.6).

[0017]

The gel after the end of migration, The method of Matsudaira. (And) [ P. Matsudaira, Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difl ] J. According to Biol. Chem., 262, and 10035-10038 (1987), 10 Protein was used as the PVDF (polyvinylidene fluoride) film electro blotting in the mM CHAPS buffer (pH 11) for 3 hours (1 mA/cm). After a PVDF film's performing CBB dyeing as it is, or dipping it for 5 minutes into fixing fluid (50% methanol 10% acetic acid-water) and fixing protein, CBB dyeing was performed after washing in methanol and the TBS solution (0.154 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5).

[0018]

CBB dyeing was performed as follows. That is, in decolorization liquid (50% methanol 10% acetic acid-water), after dyeing promptly the PVDF film which transferred protein for 5 minutes in CBB-50% methanol staining liquid 0.1%, decolorization and after rinsing, it dried under decompression further. The film was saved in the -20 \*\* freezer in the state where it dried.

[0019]

Immunity dyeing was performed as follows. That is, electroblotting (1 mA/cm) of the gel after the end of migration was carried out to the nitrocellulose membrane for 90 minutes in the blotting buffer (0.1% SDS, 20% methanol, 0.05M Tris-glycine). After dipping the transferred film in acetic acid liquid 1%, it was dipped in 0.1% Ponceaux S liquid, and dyed protein. After acetic acid liquid removed the coloring matter to which it stuck 1%, it color-printed the film which protein was dyed. Next, after shaking a film all over TBS and decolorizing protein, the film was processed by entering powdered skim milk TBS 4%, and also the film was dipped in the liquid same as the above which added the primary antibody, and the antigen-antibody reaction was made to perform. The film was processed with the enzyme-labeling second antibody liquid which dissolved in entering powdered skim milk TBS 4% after washing with Tween-20 (trade name) content TBS liquid (TBST). The film was dipped in coloring liquid after washing by TBST, and the proteinic spot made into the purpose was made to color on it.

[0020]

The primary antibodies used for immunity dyeing are anti-amyloid A 1 antibody, an anti-amyloid A 2-beta antibody, and an anti-apolipoprotein E antibody. According to the animal species which produced the primary antibody, the anti-sheep, the anti-goat, the anti-mouse, and anti-rabbit antibody which carried out the sign by peroxy dace were used for the second

antibody. Diamino benzidine (DAB) was used as coloring liquid.

[0021]

On the other hand, the spot of protein on the PVDF film which carried out CBB dyeing is cut off, After washing in an 80% methanol aqueous solution, it applied to the protein sequencer and the amino acid sequence of proteinic N terminal region was determined (Hewick, R.M. et al., J. Biol. Chem. 1981, 256, 7990-7997).

[0022]

As a result, it was dyed only about the Alzheimer disease patient origin sample, and five spots which were not dyed were found out about the patient of other illnesses, and the sample of healthy person origin. The position after the two dimensional electrophoresis of these spots is typically shown in drawing 1. The amino acid sequence, isoelectric point, and molecular weight of N terminal region of the protein which constitutes these spots are shown in the following table 1 with a proteinic name.

[0023]

[Table 1]

Spot No.	N末端配列	同定タンパク質	等電点	分子量
1	配列番号 1	アミロイドA1, 1/G(R), 70/A(V)	6.5	11.7 K
2	配列番号 2	アミロイドA1, 70/A(V), 75/V(A), 90/D(G)	5.9	11.8 K
3	配列番号 3	アミロイドA2- $\beta$ , 70/R(W), 89/R(H)	6.8	8.6 K
4	配列番号 4	アポリポプロテインE4	5.7	34.0 K
5	配列番号 5	アポリポプロテインJ $\beta$ 鎖	6.3	24.2 K

[0024]

The display which "A(V) [ 70 / ]" Becomes among Table 1 means that the 70th valine has varied to the alanine.

[0025]

As mentioned above, the specific protein contained only in an Alzheimer disease patient's plasma was able to be detected from the blood of only 200microl by the method of this invention.

[0026]

[Effect of the Invention]

By this invention, the method of inspecting dementia, such as an Alzheimer disease, with the immunological technique using samples, such as a little

blood about only 10-200microl, was provided for the first time. According to the method of this invention, dementia can be correctly inspected to high sensitivity.

[0027]

[Layout Table]

# SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Method for Diagnosing Dementia

<130>

<160> 5

[0028]

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg 1 5 10 15

[0029]

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp 1 5 10

15

[0030]

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly

1

5

10

[0031]

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro

1

5

10

[0032]

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Gln Thr Val Ser Asp Gln Glu Leu Gln Glu

1

5

10

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] In the example of this invention, it is the figure which appeared by two dimensional electrophoresis and subsequent immunity dyeing and showing the spot of specific protein in an Alzheimer disease patient typically.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

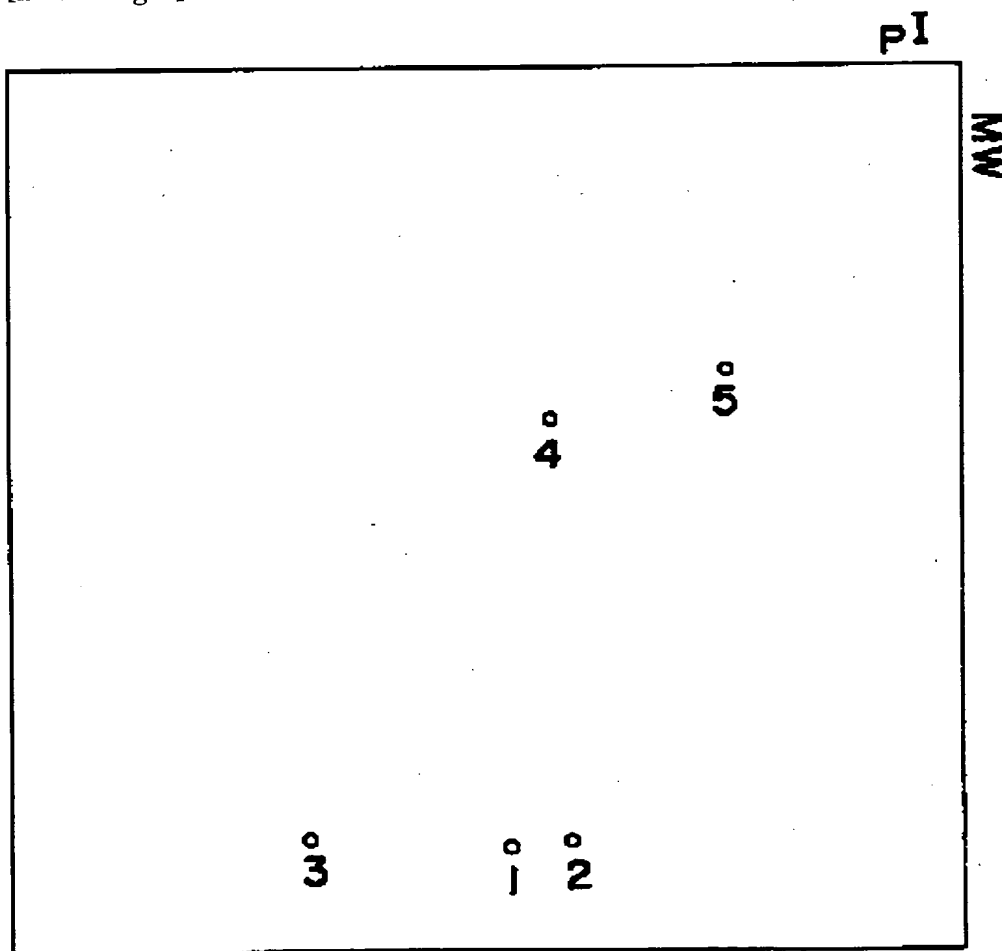
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DRAWINGS**

---

[Drawing 1]



---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-193661

(P2000-193661A)

(43) 公開日 平成12年7月14日 (2000.7.14)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード\* (参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

D

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-368607

(22) 出願日 平成10年12月25日 (1998. 12. 25)

(71) 出願人 591245543

東京理化器械株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目3番4号

(72) 発明者 次田 皓

千葉県柏市泉町17-28 石塚ビル305

(72) 発明者 上野 郁子

東京都板橋区高島平5-10-4

(72) 発明者 高橋 直行

埼玉県南埼玉郡白岡町下野田1213-40

(72) 発明者 大木 裕太

埼玉県上尾市春日1-20-11 サンパーク

春日102号

(74) 代理人 100086210

弁理士 木戸 一彦 (外1名)

(54) 【発明の名称】 痴呆症の検査方法

(57) 【要約】

【課題】 患者の少量の体液中に含まれるタンパク質を測定することにより、痴呆症の検査を行なうことができる、痴呆症の検査方法を提供すること。

【解決手段】 患者の血液、血清又は血漿である検体を採取し、該検体中に含まれる、痴呆症患者に特異的なポリペプチドと、該ポリペプチドに対する抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中に含まれる痴呆症患者に特異的なポリペプチドを測定することから成る、痴呆症の検査方法を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 患者の血液、血清又は血漿である検体を採取し、該検体中に含まれる、痴呆症患者に特異的なポリペプチドと、該ポリペプチドに対する抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中に含まれる痴呆症患者に特異的なポリペプチドを測定することから成る、痴呆症の検査方法。

【請求項 2】 前記痴呆症はアルツハイマー病である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記免疫測定は、検体を第 1 軸方向には等電点、第 2 軸方向には分子量に基づき分離する二次元電気泳動にかけ、電気泳動パターンを維持したままスポットのアミノ酸配列の確認を行なう請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記ポリペプチドは、アミロイド A 1、アミロイド A 2-β、アポリポプロテイン E 4 及びアポリポプロテイン J β 鎖から成る群より選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アルツハイマー病のような痴呆症の検査方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、アルツハイマー病のような痴呆症の検査は、知能テストと、CT テスト等の脳の形態学的変化を判断基準として行なわれている。しかしながら、これらの検査は、間接的なものであり、必ずしも痴呆症を正確に診断することができない。

【0003】一方、アミロイドのような、アルツハイマー病患者に特異的に現れるタンパク質が存在することも知られている。しかしながら、これらのタンパク質は患者の脳細胞から得られるものであり、検査のために患者から脳細胞を採取することは困難であるから、これらのタンパク質を検出することによりアルツハイマー病の検査を行なうことは従来行なわれていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、患者の少量の体液中に含まれるタンパク質を測定することにより、痴呆症の検査を行なうことができる、痴呆症の検査方法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者は、鋭意研究の結果、痴呆症患者に特異的なタンパク質が血液に含まれ、かつ、採取可能な少量の血液に含まれる該タンパク質を免疫測定により測定することができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、患者の血液、血清又は血漿である検体を採取し、該検体中に含まれる、痴呆症患者に特異的なポリペプチドと、該ポリペプチドに対

する抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中に含まれる痴呆症患者に特異的なポリペプチドを測定することから成る、痴呆症の検査方法を提供する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】本発明の方法により検査することができる痴呆症は、該痴呆症の患者に特有なポリペプチドが、少量の血液中に測定可能な量存在するものであれば特に限定されるものではなく、アルツハイマー病、ダウン症等を挙げることができる。なお、本発明において、「ポリペプチド」とは、糖タンパク質のように、糖鎖等により修飾されたポリペプチドをも包含する。

【0008】本発明の方法では、患者の血液、血清又は血漿(以下、「血液等」)中に含まれる、痴呆症患者に特異的なポリペプチドを測定する。ここで、「痴呆症患者に特異的なポリペプチド」には、痴呆症患者にのみ存在し、健常人には存在しないポリペプチド、痴呆症患者及び健常人の両者に存在するが、その存在量が両者において有意に異なるもの、並びに痴呆症患者及び健常人の両者に存在するが、その構造が両者において異なるもの、が含まれる。検査対象がアルツハイマー病の場合、このようなポリペプチドの例としてアミロイド A 1、アミロイド A 2-β、アポリポプロテイン E 4 (D. J. Selkoe, Alzheimer's Disease: Genotypes, phenotype and treatments, Science 275, 630 (1997))、アポリポプロテイン J β 鎖(The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amylo beta is complexed to SP-40, 40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex, J. Ghiso et al., Biochem. J. 293, 27-30 (1993))並びにプレセニリン 1 及び 2 (D. J. Selkoe, Alzheimer's Disease: Genotypes, phenotype and treatments, Science 275, 630 (1997))等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。これらのポリペプチドは、その全領域のアミノ酸配列が公知である。

【0009】本発明の方法では、痴呆症患者に特異的なポリペプチドと、該ポリペプチドに対する抗体との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中に含まれる痴呆症患者に特異的なポリペプチドを測定する。ここで用いられる抗体としては、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、これらは周知の方法により調製することができる。なお、「痴呆症患者に特異的なポリペプチド」が、痴呆症患者及び健常人の両者に存在するがその構造が異なるものである場合には、痴呆症患者に存在するポリペプチドと反応するが健常人に存在する当該ポリペプチドとは反応しない抗体を用いる必要があることは言うまでもない。また、免疫測定法自体もこの分野において周知であり、血液等の中に含まれる上記特異的なポリペプチドを測定できる感度を有する限り、いかなる公知の免疫測定法をも採用することができる。すなわち、測定原理に従って分類すれば、サンドイッチ法、

競合法、凝集法等があり、標識に従って分類すれば、酵素法、蛍光法、放射法、ビオチン法等があるが、これらのいずれをも採用することができる。なお、本発明において、「測定する」とは、定量及び検出の両者を包含する。

【0010】特に正確で高感度な、好ましい方法として、抗原抗体反応に先立ち、検体を第1軸方向には等電点、第2軸方向には分子量に基づき分離する二次元電気泳動にかけ、電気泳動パターンを維持したままイムノブロッティングを行なう方法を挙げることができる。この方法を用いる場合には、検体は血球成分を含まない血清又は血漿を用いることが好ましい。なお、等電点電気泳動、分子量に基づいて分離する電気泳動及びイムノブロッティングの手法自体は、この分野において周知であり、下記実施例にも具体例が詳細に記載されている。

#### 【0011】

【実施例】以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0012】実施例1

60～70歳代のアルツハイマー患者、同年代の同疾病以外の患者及び健康なボランティアからクエン酸ナトリウム存在下に採取した血液各200 $\mu$ lから血漿を分離し、-20℃のフリーザー中に凍結保存したものを実験材料とした。

【0013】ヒト血漿タンパク質をトリフロロ酢酸(TCA)で沈殿させ、沈殿したタンパク質に混在する脂肪、塩類等をエーテルで洗浄除去した。これらの操作は具体的には次のように行なった。

【0014】室温で融解したヒト血漿検体各100 $\mu$ lを小型チューブに取り分けて氷水中で冷やし、氷冷した5.5%TCA溶液1mlを加えて混和した。この混和液を1時間氷冷した後、4℃に冷却した小型の高速遠心分離機で16000rpm、15分間遠心分離した。上清を捨てた後、沈殿に氷冷した水150 $\mu$ lを加えて懸濁液とした。これを1mlずつのエーテルで5回洗浄した。エーテルを除去した後、残留した水層を減圧下で除去した後にタンパク質に350 $\mu$ lの緩衝液(2% Nonidet-P40(商品名)、9.8M尿素、2% Pharmalyte(商品名)、1.5% ディチオスライトール(DTT))を加えて溶解した。溶液には、Bio Rad社製の低分子量マーカーと微量のブロムフェノールブルーを加えた。

【0015】上記の方法で調製したタンパク質溶液をファルマシア社製のゲル膨潤容器に入れ、これにファルマシア社製等電点電気泳動用乾燥ゲルストリップ(Immobilone dry strip pH 3-10, (18cm又は11cm))を浸し、16時間ゲルを膨潤させ、同時にタンパク質溶液を吸収させた。

【0016】膨潤させたゲルストリップを初めは3時間500V、続いて500V-3500V 5時間、最後に3500V 15時

間の全体で64kVhをかけ等電点電気泳動した。泳動後、ゲルストリップは、平衡バッファー(6M尿素、3% SDS、50mM Tris-HCl (pH6.8))中で平衡化した後、12.5%ポリアクリルアミド平板ゲル(20cm $\times$ 20cm $\times$ 1cm)上に密着させ、16W/gelの電力でTris-グリシンバッファー(Cathode 25mM Tris, Anode 50mM Tris, 1% SDS, pH8.6)中で二次元目の電気泳動を行なった。

【0017】泳動終了後のゲルは、Matsudairaの方法(P. Matsudaira, Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblooded onto Polyvinylidene Difluoride Membranes, J. Biol. Chem., 262, 10035-10038 (1987))に従って、10mM CHAPSバッファー(pH 11)中で3時間タンパク質をPVDF(ポリビニリデンフルオリド)膜にelectro blotting (1mA/cm)した。PVDF膜はそのままCBB染色を行なうか、又は固定液(50%メタノール-10%酢酸-水)中に5分間浸してタンパク質を固定した後、メタノール、TBS溶液(0.154M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.5)中で洗浄してからCBB染色を行なった。

【0018】CBB染色は次のようにして行なった。すなわち、タンパク質を転写したPVDF膜を直ちに0.1% CBB-50%メタノール染色液中で5分間染色した後、脱色液(50%メタノール-10%酢酸-水)中で脱色、さらに、水洗した後減圧下で乾燥した。膜は、乾燥した状態で-20℃のフリーザー中に保存した。

【0019】また、免疫染色は、次のようにして行なった。すなわち、泳動終了後のゲルは、ブロッティングバッファー(0.1% SDS, 20%メタノール、0.05M Tris-グリシン)中で90分間ニトロセルロース膜にエレクトロブロッティング(1mA/cm)した。転写した膜は1%酢酸液に浸した後、0.1%ボンソーS液に浸し、タンパク質を染色した。吸着した色素は1%酢酸液で除去した後、タンパク質が染色された膜をカラープリントした。次にTBS中で膜を振盪してタンパク質を脱色した後、4%脱脂粉乳入りTBSで膜を処理し、更に一次抗体を加えた同上液に膜を浸して抗原抗体反応を行なわせた。膜はTween-20(商品名)含有TBS液(TBST)で洗浄後、4%脱脂粉乳入りTBSに溶解した酵素標識二次抗体液で処理した。膜はTBSTで洗浄後、発色液に浸し、目的とするタンパク質のスポットを発色させた。

【0020】なお、免疫染色に用いた一次抗体は、抗アミロイドA1抗体、抗アミロイドA2- $\beta$ 抗体及び抗アポリポプロテインE抗体である。また、二次抗体は、一次抗体を作製した動物種に応じて、パーオキシデースで標識した抗羊、抗山羊、抗マウス、抗兔抗体を用いた。発色液としては、ジアミノベンチジン(DAB)を用いた。

【0021】一方、CBB染色したPVDF膜上のタンパク質のスポットを切り取り、80%メタノール水溶液中で洗

浄した後、プロテインシーケンサーにかけ、タンパク質のN末端領域のアミノ酸配列を決定した(Hewick, R. M. et al., J. Biol. Chem. 1981, 256, 7990-7997)。

【0022】その結果、アルツハイマー病患者由来検体についてのみ染色され、他の疾病の患者及び健康人由来の検体については染色されなかったスポットが5個見出\*

\*された。これらのスポットの二次元電気泳動後の位置を図1に模式的に示す。また、これらのスポットを構成しているタンパク質のN末端領域のアミノ酸配列、等電点及び分子量をタンパク質の名称と共に下記表1に示す。

【0023】

【表1】

Spot No.	N末端配列	同定タンパク質	等電点	分子量
1	配列番号1	アミロイドA1, 1/G(R), 70/A(V)	6.5	11.7 K
2	配列番号2	アミロイドA1, 70/A(V), 75/V(A), 90/D(G)	5.9	11.8 K
3	配列番号3	アミロイドA2-β, 70/R(W), 89/R(H)	6.8	8.6 K
4	配列番号4	アポリポプロテインE4	5.7	34.0 K
5	配列番号5	アポリポプロテインJβ鎖	6.3	24.2 K

【0024】なお、表1中、例えば、「70/A(V)」なる表示は、70番目のバリンがアラニンに変異していることを意味する。

【0025】上記のように、本発明の方法により、アルツハイマー病患者の血漿中にのみ含まれる特異的なタンパク質を、わずか200μlの血液から検出することができた。

【0026】

【発明の効果】本発明により、わずか10～200μl程度の少量の血液等の検体を用いて免疫学的手法によりアルツハイマー病等の痴呆症の検査を行なうことができ※

※る方法が初めて提供された。本発明の方法によれば、痴呆症を正確にかつ高感度に検査することができる。

【0027】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Method for Diagnosing Dementia

<130>

<160> 5

【0028】

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg

1

5

10

15

【0029】

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp

1

5

10

15

【0030】

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly

1

5

10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro

1

5

10

【0032】

【0031】

(5)

特開 2000-193661

8

7

<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 5

Asp Gln Thr Val Ser Asp Gln Glu Leu Gln Glu  
1 5 10

\* 【図 1】本発明の実施例において、二次元電気泳動及びその後の免疫染色により現れた、アルツハイマー病患者に特異的なタンパク質のスポットを模式的に示す図である。

【図面の簡単な説明】

\*

【図 1】

